

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2001-116750

(43)Date of publication of application : 27.04.2001

(51)Int.Cl.

G01N 33/53
C07K 1/04
C12N 15/09
C12Q 1/00
C12Q 1/68
G01N 1/00
G01N 1/10
G01N 31/22
G01N 33/566
G01N 35/02
G01N 35/10
// C12M 1/34

(21)Application number : 11-299803

(71)Applicant : NGK INSULATORS LTD

(22)Date of filing : 21.10.1999

(72)Inventor : YAMADA SAICHI
KAWASE MITSUO**(54) METHOD FOR MANUFACTURING REACTIVE CHIP, REACTIVE CHIP MANUFACTURED BY THE METHOD AND REACTIVE SUBSTANCE****(57)Abstract:**

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method in which a reactive chip is manufactured in such a way that a reactive substance such as a DNA fragment or the like which can be prepared economically is integrated with a high integration degree by a method wherein a photolithographic installation is not required when a probe is synthesized or when the probe is mounted on a substrate, a sample such as the high-cost and valuable DNA fragment or the like capable of being obtained only in an extremely limited amount is used as the probe and the sample is used quickly, surely and in an extreme trace amount, to provide a reactive chip which is manufactured by the method, to provide a method in which a reactive substance such as a DNA fragment or the like is synthesized quickly and economically and to provide a reactive substance which is manufactured by the method.

SOLUTION: A reactive substance such as a DNA fragment or the like in a prescribed amount is mounted, at high speed and by using a jet nozzle, on a prescribed spot on a substrate on which spots in the prescribed number are formed. Thereby, a reactive chip in which the reactive substance is integrated on its surface with a high integration degree is manufactured. By using a method for its manufacture, reactive substances such as peptides or the like in a small amount but in kinds exceeding several thousands are synthesized at a time, quickly and economically.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

24.07.2003

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2001-116750

(P2001-116750A)

(43) 公開日 平成13年4月27日 (2001. 4. 27)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコ-ト* (参考)
G 0 1 N 33/53		G 0 1 N 33/53	M 2 G 0 4 2
C 0 7 K 1/04		C 0 7 K 1/04	2 G 0 5 8
C 1 2 N 15/09		C 1 2 Q 1/00	C 4 B 0 2 4
C 1 2 Q 1/00		1/68	A 4 B 0 2 9
1/68		G 0 1 N 1/00	1 0 1 K 4 B 0 6 3
審査請求 未請求 請求項の数15 O L (全 7 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願平11-299803

(22) 出願日 平成11年10月21日 (1999. 10. 21)

(71) 出願人 000004064

日本碍子株式会社

愛知県名古屋市瑞穂区須田町 2 番56号

(72) 発明者 山田 佐一

愛知県名古屋市瑞穂区須田町 2 番56号 日

本碍子株式会社内

(72) 発明者 川瀬 三雄

愛知県名古屋市瑞穂区須田町 2 番56号 日

本碍子株式会社内

(74) 代理人 100088616

弁理士 渡邊 一平

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 反応性チップの製造方法、同方法により製造されうる反応性チップ、および反応性物質

(57) 【要約】

【課題】 プローブの合成や、あるいは、プローブの基板への登載にフォトリソグラフィ設備を必要とせず、また、高価で、加えて、極めて限定的な量しか入手できない貴重なDNA断片等の試料をプローブとして使用して、迅速で、確実に、かつ極めて微量を使用することにより、経済的に作製できるDNA断片等の反応性物質を高集積度で集積した反応性チップを製造する方法、同方法により製造されうる反応性チップ、およびDNA断片等の反応性物質を迅速、かつ経済的に合成する方法、同方法により製造されうる反応性物質の提供。

【解決手段】 所定の数のスポットを形成した基板上の所定のスポットに、所定量のDNA断片等の反応性物質を高速で、ジェットノズルを使用して、登載することにより、反応性物質をその表面に高集積度で集積した反応性チップを製造すること、および同方法を利用することにより、少量ではあるが数千を超える種類のペプチド等の反応性物質を一度に、迅速、かつ経済的に合成することにより達成。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 反応性物質と反応する基板を用意し、同基板上の所望の位置に所定量の反応性物質を含む溶液を1スポット当たり5ピコリッター以上の量で少なくとも毎秒5個の割合で、少なくとも10個の吐出孔を有するノズルから吐出させることによって、所望とする反応性物質を基板に固定することからなる反応性チップの製造方法。

【請求項2】 基板がガラスもしくはシリコン製であり、その表面は親和性付与の為に表面処理されているものである請求項1に記載の反応性チップの製造方法。

【請求項3】 反応性物質が、DNA断片、cDNA、RNA、酵素、抗原、抗体、エピトープ、タンパク質、ポリヌクレオチド、ペプチドからなる群から選ばれた少なくとも1種である請求項1に記載の反応性チップの製造方法。

【請求項4】 基板が、1cm²当たり少なくとも10,000個のスポットを有するものである請求項1に記載の反応性チップの製造方法。

【請求項5】 請求項1～4の何れか1項に記載の方法により製造されうる反応性チップ。

【請求項6】 反応性物質原料と反応する基板を用意し、同基板上の所望の位置に所定量の反応性物質原料を含む溶液を1スポット当たり5ピコリッター以上の量で少なくとも毎秒5個の割合で、少なくとも10個の吐出孔を有するノズルから吐出させることによって、所望とする反応性物質を基板上で合成し固定することからなる反応性チップの製造方法。

【請求項7】 基板がガラスもしくはシリコン製であり、その表面は親和性付与の為に表面処理されているものである請求項6に記載の反応性チップの製造方法。

【請求項8】 反応性物質が、ポリヌクレオチド、ペプチドからなる群から選ばれた少なくとも1種である請求項6に記載の反応性チップの製造方法。

【請求項9】 基板が、1cm²当たり少なくとも10,000個のスポットを有するものである請求項6に記載の反応性チップの製造方法。

【請求項10】 請求項6～9の何れか1項に記載の方法により製造されうる反応性チップ。

【請求項11】 反応性物質原料と反応する基板を用意し、同基板上の所望の位置に所定量の反応性物質原料を含む溶液を1スポット当たり5ピコリッター以上の量で少なくとも毎秒5個の割合で、少なくとも10個の吐出孔を有するノズルから吐出させることによって、所望とする反応性物質を基板上で合成し、次いで合成した反応性物質を基板から分離することからなる反応性物質の製造方法。

【請求項12】 基板がガラスもしくはシリコン製であり、その表面は親和性付与の為に表面処理されているものである請求項11に記載の反応性物質の製造方法。

【請求項13】 反応性物質が、ポリヌクレオチド、ペプチドからなる群から選ばれた少なくとも1種である請求項11に記載の反応性物質の製造方法。

【請求項14】 基板が、1cm²当たり少なくとも10,000個のスポットを有するものである請求項11に記載の反応性物質の製造方法。

【請求項15】 請求項11～14の何れか1項に記載の方法により製造されうる反応性物質。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、DNAの機能解析や遺伝子の変異、発現の解析そして癌などの各種疾病の診断・治療等に使用される反応性材料およびその作製方法に関する。本発明は、DNA等の解析等にプローブ等として使用される、DNA断片、cDNA、ポリペプチド、オリゴヌクレオチド等の物質を基板に固定させた反応性チップ、または反応性物質を効率よく製造する方法、並びに同方法で製造された反応性チップ、または反応性物質に関する。

【0002】

【従来の技術】 遺伝子の先天的異常に起因する遺伝病やDNAの突然変異等に起因する疾患、例えば、各種の癌の診断等にDNAチップが一部で使用されている。一方、各種生物のゲノム塩基配列の解読が進み、その知見に基づき遺伝子の機能解析を目的とする研究開発が一段と活発化してきている。ところで、遺伝子の機能解析には、遺伝子の個体差や変異、細胞内での発現の頻度などを、効率よく測定する技術の開発が求められている。そのような技術に使用されるものにDNAチップがある。DNAチップは、通常の約1cm角の基板上に1万種類以上のDNA断片（DNAプローブ）を載せたものである。例えば、癌などの検査のために遺伝子の突然変異を検査する際に、所定のプローブを含むDNA断片が予め登録された上記チップ上に、蛍光標識したDNA断片からなる被検試料を添加すると、上記DNAチップ上の所定のプローブと相補的な配列を有する蛍光標識したDNA断片は、ハイブリダイゼーションを起こしてプローブと結合し、洗浄後も同チップ上に残される。このものに紫外線を照射すると、ハイブリダイゼーションにより固定されたものだけが蛍光を発するので、このものを同定することにより、被検試料中のDNA断片の配列や変異箇所を解明することができる。なお、この方法は、既に、一部癌遺伝子の突然変異の検出に使用されている。

【0003】 上記DNAチップの作成方法としては、一つには、半導体産業で使用されているフォトリソグラフィの技術を応用したものがある。この方法は、フォトリソグラフィックマスクを使用して、所定のプローブを基板上で合成してオリゴヌクレオチドのDNAチップを製造する方法で、所定のプローブを登録したDNAチップを作成するためには、それに応じた莫大な数のフォ

トリソグラフィックマスクを製造しなければならず、そのコストだけでも膨大なものとなる。従って、固定する DNA プローブの種類が少数の場合には、所望とする数のフォトリソグラフィックマスクを製造し、これを使用して目的とする DNA チップを作成し、提供することは費用の点、工数の点を無視すれば、できないことではない。ところが、研究者が研究用に独自の DNA プローブを DNA チップ上に固定したい場合、高額なフォトリソグラフィックマスクを製造する設備を備えなければならず、実質的に不可能である。勢い、高価なフォトリソグラフィックマスクを製造する装置を有するところに、その作成を委嘱しなければならず、研究の秘密保持性や、研究費の捻出の点等から見て、特定の研究者にのみ可能な方法と言わざるを得ない。だからといって、所望するオリゴヌクレオチドを予め合成した合成品をスポッティングするのでは、何万種類以上を合成する必要がある、この方法も繁雑かつ、不経済である。

【0004】 一方、所望のプローブ等の試料を特定基板上の所定の位置に登載する方法としては、所謂スポッティング方法があるが、このものは、羽ペンを使用するものであるために、スポッティングによる集積度を上げるには、限界がある。そこで、集積度を上げる方法としては、ピンおよびリング方式を利用した技術が知られている。しかしこの方法でも、スポッティング部材の先端部分の直径は、その製造技術上の物理的制約から最小化するとしても限度があり、最小でも一回のスポッティング量が 1 nl と大きく、高価な各種プローブを使用しなければならない DNA チップを製造する方法としては必ずしも好ましい方法とはいえない。さらに、スポッティング中におけるスポッティング用ピンの先端部が変形するという問題がある。先端部が変形すると当然スポッティング量も不規則とならざるを得ず、また、予め所定量のプローブ等を登載することが困難であり、定量用の目的には使用できないと言う問題がある。さらには、スポッティング速度が 4 スポット/秒とかかり、チップの製造に多大な時間を要する。ところで、特開平 10-248599 号公報には、スポッティング方法の変法の 1 つとして伸縮性の基材を使用し、その基材を少なくとも元の長さの 2 倍に延伸し、これにスポッティングする技術が提案されている。この方法は、伸縮性の基材を 1 次元又は 2 次元に、各延伸方向の長さを少なくとも延伸前の 2 倍に延伸し、基材表面上の拡大された各微小区分に同種または異種の DNA 断片、酵素、抗原、抗体、エピトープまたはタンパク質等の反応性物質をスポッティングノズルを用いて一定数以上の反応性物質を一度に担持させ、次いで基材を延伸前の大きさに収縮させることによる、 1 cm^2 当たりの微小区分として少なくとも 100 個を有するである反応性チップを製造する方法である。所定のプローブを登載した反応性チップを作成するには、簡便な方法であることができるが、製造に

際し、基板を延伸させる必要があるために作成に際しては習熟を要し、また、スポッティング速度も、フォトリソグラフィックマスクを使用する方法と比較すれば、早いものの、依然として、秒速 4~10 スポット程度であり、必ずしも製造速度が経済的なレベルに達しているとはすることはできない。さらに、反応性物質を新たに合成してプローブを作成する方法としては、スポッティングの度に延伸操作を繰り返すことが必要となるために、基板の物性からも、操作の煩雑性からも、実質的に不可能である。さらに、DNA の解析や、新たな遺伝子材料の創出には、少量の cDNA、ポリペプチド、オリゴヌクレオチドなどを用いて効率よく作成することが必要である。しかし現時点では、これらの物質を固定したチップ、およびこれらの物質そのものを効率よく製造する方法が提供されていないのが現状である。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】 そこで本発明の目的は、DNA 等の解析等にプローブ等として使用される、DNA 断片、cDNA、ポリペプチド、オリゴヌクレオチド等の物質を基板に固定させた反応性チップおよび反応性物質を効率よく製造する方法、並びに同方法により製造されうる反応性チップおよび反応性物質を提供することにある。より具体的には、プローブの合成を伴うプローブの基板への登載（担持）にもフォトリソグラフィ設備を必要とせず、また、高価で、加えて、極めて限定的な量しか入手できない貴重な試料をプローブとして使用する場合でも、迅速で、確実に、かつ経済的に作製できる DNA 断片等の、反応性物質を高集積度で集積した反応性チップを製造する方法、および同方法により製造されうる反応性チップ、並びにポリヌクレオチド、ペプチド等の反応性物質を迅速、かつ経済的に合成する方法および同方法により製造されうる反応性物質の提供にある。

【0006】

【課題を解決するための手段】 本発明は、基板上の所定のスポットに、所定量のヌクレオチド、cDNA、DNA 断片、酵素、抗原、抗体、エピトープまたはタンパク質等の反応性物質を高速で、インクジェットノズルを使用して、供給し、スポット表面固定させることにより、所望とする反応性チップを製造すること、および基板上の所定のスポットに、所望とするヌクレオチド、cDNA、DNA 断片、酵素、抗原、抗体、エピトープまたはタンパク質等の反応性物質を合成するための原料を高速で、インクジェットノズルを使用して、供給し、スポット表面および／または中間体と反応させることにより、所望とする反応性物質を製造することにより上記の目的を達成することを見いだして、本発明を完成させたものである。同方法によれば、反応性チップの製造は勿論、プローブ等として使用される可能性のあるペプチド等の反応性物質を、条件によっては、数千を超える種類

を同時に合成できる。

【0007】

【発明の実施の形態】 即ち、本発明によれば、第1に、反応性物質と反応する基板を用意し、同基板上の所望の位置に所定量の反応性物質を含む溶液を1スポット当たり5ピコリッター以上の量で少なくとも毎秒5個の割合で、少なくとも10個の吐出孔を有するノズルから吐出させることによって、所望とする反応性物質を基板に固定することからなる反応性チップの製造方法が、第2に、上記に記載の方法により製造された反応性チップが、第3に、反応性物質原料と反応する基板を用意し、同基板上の所望の位置に所定量の反応性物質原料を含む溶液を1スポット当たり5ピコリッター以上の量で少なくとも毎秒5個の割合で、少なくとも10個の吐出孔を有するノズルから吐出させることによって、所望とする反応性物質を基板上で合成し固定することからなる反応性チップの製造方法が、第4に、上記に記載の方法により製造された反応性チップが、第5に、反応性物質原料と反応する基板を用意し、同基板上の所望の位置に所定量の反応性物質原料を含む溶液を1スポット当たり5ピコリッター以上の量で少なくとも毎秒5個の割合で、少なくとも10個の吐出孔を有するノズルから吐出させることによって、所望とする反応性物質を基板上で合成し、次いで合成した反応物質を基板から分離することからなる反応性物質の製造方法が、第6に、上記に記載の方法により製造された反応性物質が提供される。

【0008】 本発明の第一、第二の側面は、反応性チップの簡便で経済的な製造方法、および同方法で製造される反応性チップに関する。第三の側面は、反応性物質の簡便で経済的な製造方法、および同方法で製造される反応性物質に関する。なお、本明細書において、反応性物質とは、新たな医薬品の創出や遺伝子診断、診断薬等に使用される、DNA断片、cDNA、ペプチド、オリゴヌクレオチド、酵素、抗原、抗体、エピトープ、タンパク質等の反応性物質を挙げることができるが、当然のことながらこれらに限定されるものではない。また、ここで固定とは、所定の条件下で、イオン結合や共有結合、水素結合、配位結合、ファンデアワールス力、化学吸着、物理吸着等による結合により相互に分離が不可能な状態で結合し、移動不可能な状態になることを言う。また、反応性物質とは、生体試料であるDNA断片、生理活性物質などと結合しうる物質をいい、具体的には、DNA断片、cDNA、酵素、抗体などを言う。さらに、反応性チップとは、上記のような反応性物質を基板上に登載、固定したものを言う。なお、ここで、基板とは、ガラス製のスライドガラス、シリコンなどを言う。勿論、基板の表面には、反応性物質との親和性等を付与する目的で、ポリマーリン、シラン化等の適当な表面被覆処理を施してもよい。なお、通常、基板上に

は、その用途に応じて、1個当たりの容積が、通常は30ピコリッター容程度ある微細なスポットが少なくとも100個、好ましくは、1,000個以上、より好ましくは10,000個以上設けられている。

【0009】 本発明の第一の側面である反応性チップの製造方法は、所望の数のスポット、例えば、少なくとも5ピコリッター、好ましくは少なくとも30ピコリッター容のスポットを少なくとも100個形成した基板を用意し、同基板上の所望の位置に位置するスポットに、所望量の反応性物質を含む溶液を1スポット当たり5ピコリッター以上の量、好ましくは100ピコリッター以下の量を、少なくとも毎秒5個以上の速度で、少なくとも10個の吐出孔を有するジェットノズルから吐出させることによって、所望とする反応性物質を基板に固定することよりなる、反応性物質の製造方法に関する。より好ましくは、1cm²当たり少なくとも1,000個、好ましくは、10,000個程度のスポットを形成した基板を用意し、同基板上の所定位置に位置するスポットに、所定量のヌクレオチド、DNA断片、酵素、抗原、抗体、エピトープまたはタンパク質等の反応性物質の溶液を、上記の容量でかつ高速で、ジェットノズルから吐出し、所望のスポット所望とする反応性物質が固定されるまで、この吐出操作を繰り返すことよりなる、反応性物質を製造する方法に関する。

【0010】 ここで言う、ジェットノズルとは、圧電／電歪素子を利用したものをいい、所望数のノズル、例えば、少なくとも10、好ましくは、1,000個のノズルが設けられたカートリッジ式ノズルに所定の部材を登載して構成されるものである。より具体的には、本発明の出願人らに係る出願である特開平6-40030号公報に記載のインクジェット用ヘッドがノズルとして好適に使用される。吐出量などの調整は、予め組み込まれたCPU等により行えばよい。

【0011】 なお、上記のインクジェット用ヘッドとは、上記公報に記載の通り、インク粒子を噴射させる複数のノズル孔が設けられたインクノズル部材に対して、前記ノズル孔に対応する複数の空所が設けられたインクポンプ部材を重ね合わせて接合することにより、前記各ノズル孔の背後にそれぞれインク加圧室を形成し、該インク加圧室の壁部の一部を、圧電／電歪素子によって変形させて前記インク加圧室に圧力を生ぜしめることにより、該インク加圧室に供給されるインクを、前記ノズル孔より噴射させるようにしたインクジェットプリントヘッドにおいて、前記空所を形成する複数の窓部が設けられたスペーサプレートと、該スペーサプレートの一の方の側に重ね合わされて前記窓部を覆蓋する閉塞プレートと、該スペーサプレートの他方の側に重ね合わされて前記窓部を覆蓋する、前記インクノズル部材のノズル孔に対応した位置に各々該ノズル孔への連通用開口部が設けられた接続プレートとを、それぞれグリーンシートにて

積層形成し、一体焼成せしめてなるセラミックス体により、前記インクポンプ部材を構成すると共に、前記閉塞プレートの外面上に膜形成法によって形成された電極および圧電／電歪層からなる圧電／電歪作動部により、前記圧電／電歪素子を構成したことを特徴とするインクジェットプリントヘッドを言う。

【0012】 上記のノズルを使用することにより、吐出特性が向上するだけでなく、一度に少なくとも1,000個、好ましくは、10,000個以上スポッティングできる。また、吐出速度も速いために、1,000個のノズルを形成させたものを使用した場合でも、1秒当たり、約10,000個のスポッティングが可能である。さらに、1スポット当たりの吐出量も非常に微量で、一回の吐出量は、通常、5～20ピコリッター（p1）であり、使用する高価で貴重な反応性物質の試料を高効率に使用することが可能となる。なお、反応性物質の供給は、インク供給路として設けられた供給路を介して行えばよく、試料は、同供給路に連結した試料供給用カートリッジに一時的に保存したものを同供給路を介して供給すればよい。なお、インクジェットとしての使用とは異なり、所定のスポット内に正確に吐出させると共に、近接するスポットへの飛散をさけるために、吐出圧を0.2～2（kgf/cm²）とすることが好ましい。0.2（kgf/cm²）以下だと、均一な吐出量が確保できず、また、2（kgf/cm²）を超えると近接するスポットに飛散する可能性があるので好ましくない。

【0013】 なお、本発明の第二の側面に係る方法においては、所望の反応性物質の製造用原料を供給することにより、固相法による核酸合成や、ペプチド合成も可能となる。つまり、上記の本発明の第一の側面に係る方法において採用される条件に準じて特定の試薬を順次供給しながら反応させることにより、所望の位置に所望の反応性物質、例えば、プローブ等として有用なオリゴヌクレオチド、ペプチドを極めて微量な量で数100～数万種類を搭載した反応性チップを製造することが可能となる。上記のようにして合成された所望の反応性物質が固定された反応性チップを使用することにより、機能解析や診断や検査を容易に且つ正確にすることができる。検査や診断に利用する場合には、基板を複数の区画に分割し、各分画毎に所望とするプローブを登載してもよく、また、その一部分にのみプローブを登載してもよい。つまりその目的に応じて、プローブの登載方法を任意に選択できることとなる。

【0014】 本発明の第三の側面に係る方法によれば、一度に、少量ではあるが数千を超える種類のペプチド、オリゴヌクレオチド等の反応性物質を迅速、かつ経済的に合成することが可能である。次に、この側面にについて説明することとする。この側面においては、通常は、固相反応が使用される。一般的に、固相反応による

ペプチドやオリゴヌクレオチドの合成条件そのものは、公知である（日本生化学会編 生化学実験講座第一巻「タンパク質の化学IV 化学修飾とペプチド合成」P. 401～P. 419 東京化学同人、および生化学実験講座第一巻続編 遺伝子研究 I 「核酸の化学と分析技術」P. 16～P. 33 東京化学同人参照）。例えば、同文献に記載されているカラムに変え、基板を使用し、基板上の所定のスポットに出発原料である、反応性物質の製造用原料、例えば、オリゴヌクレオチドであればアデニン等のモノヌクレオチドの3'末端を固定し、このものに、予め5'末端以外の水酸基はトリチル基で保護されたモノヌクレオチドを上記方法を用いてスポッティングして、反応させ、未反応のモノヌクレオチドは洗浄して流し、次いで同様な手順で、次々とモノヌクレオチドを添加反応させ、所望とするオリゴヌクレオチドの反応性物質を合成する。

【0015】 より具体的には、この方法は、例えば、微細な凹部であるスポットが表面に形成されている基板、例えば、少なくとも30ピコリッター容のスポットを少なくとも100個形成した基板を用意し、基板上の所望の位置に位置する各スポットに所望の出発原料である反応性物質の出発原料を固定し、このものに、順次所望とする材料を所定量含む溶液を1スポット当たり5～20ピコリッターの量で少なくとも毎秒1000個の割合で、少なくとも1,000個の吐出孔を有するインクジェットノズルから吐出させ、反応させ、未反応の材料を洗浄除去し、以下、所望のスポットすべてに、所望とする反応性物質が形成される迄、この吐出一反応一洗浄除去操作を繰り返して、目的とする反応性物質が基板上の所望の位置するスポットに合成されるまで、次々と所望とする原料を添加反応させることよりなる、反応性物質の製造方法である。なお、この第三の側面で製造される反応性物質としては、オリゴヌクレオチド、ペプチド等が挙げられる。かくして、合成したオリゴヌクレオチド等の反応性物質は、基板に固定した状態で、上述の如く反応性チップとして用いてもよいが、適当な処理、例えば、酸やアルカリで処理することにより、基板から分離して、そのものを回収し、各種試験・検査用の試薬等として使用してもよい。本発明の第三の側面によれば、一度に、複数、場合によっては、千以上の種類のオリゴヌクレオチド、ペプチド等を手軽に合成することができる。かくして、本発明の第三の側面に係る方法により製造されうるものとして、基板上で合成され、固定された反応性物質を分離して得られる反応性物質が提供されることとなる。

【0016】 図1（a）～（h）は、オリゴヌクレオチドを合成するときの、各モノヌクレオチドを添加する手順を模式的に示した図である。先ず保護基の付いた、それぞれの塩基、アデニン（以下Aで表す）、グアニン（以下Gで表す）、チミン（以下Tで表す）、およびシ

トシン（以下Cで表す）を収納した1,000個の吐出孔を有する吐出用のノズル4本及び反応条件を変化させるのに必要なバッファ用ノズルを必要数用意し、図2に示したように順序よくA、G、C、およびTを添加し基板に固定する。固定は常法に従えばよいが、例えば、表面をシラン化したガラス基板を使用し、この上に、所定の反応させる基以外は保護基で保護したモノヌクレオチドを図1(a)～(d)に模式的に示したように順次添加、固定させ、次いで、図1(e)～(h)に模式的に示したように基板を移動させた後、反応させる基以外は保護基で保護した所望のモノヌクレオチドを順次添加し、反応させる。この操作を繰り返すことにより、通常は、先に記載した文献の記載の条件に従えば、アミダイト法の場合で、塩基数が100量体のものが、また、トリエステル法の場合で、塩基数が30～40量体の所望のオリゴヌクレオチドが合成される。

【0017】 第二の側面に関する反応性チップは、基板上に、所望とする反応性物質が所望量登載された高集積度の反応性チップである。本発明のこの側面に関する反応性チップは、一つのスポット上には、僅かに5～20ピコリッター（p1）の量の試料が登載されている過ぎないので、高価で、かつ、貴重なバイオ試料を有効に利用することができる。勿論、1つ当たりの搭載量が所定量の試料を含んだ溶液の状態では5～20ピコリッターと極めて少量であるので、当然のことながら、単位面積当たりのスポットの数も既存の反応性チップとは、大きく異なる。従来技術であるリソグラフィーを利用した方法やスポッティング方法と比較して、その集積度は、少なくとも10倍、好ましくは、100倍以上である。換言すれば、集積度を上げた状態では、1cm²当たり少なくとも10,000個、好ましくは、100,000個の反応性物質が登載されていることとなる。勿論、用途によっては、基板上に設けるスポットの数はこれよりも少なくともよく、例えば、100個程度でもよい。ただし、1個のスポットの容積は、5～20ピコリッターのプロープ等の溶液を収納できるに十分な容積が確保されればよい。

【0018】 従って、1個のスポットの容積は、少なくとも5ピコリッター容あれば充分である。また、本発明の第二の側面である上記方法により、所望とするペプチド、ヌクレオチド等の反応性物質を基板上の所定位置に合成することが可能となるので遺伝子の変異分析や機能解析、創薬開発に必要な反応性チップを、また、所望とするプロープ等を予め定められた場所に固定した、臨床試験や治療診断に必要な反応性チップをも容易に製造し、提供することができる。勿論、一定の濃度の反応液を使用すれば、所定量のプロープ等を合成、固定することができるので、定量検査にも使用可能である。また、第三の側面に関する反応性物質は、本発明の第三の側面に係る方法により、合成されうる反応性物質をいい、こ

れら反応性物質は、少量ではあるが、一度に、合成されうる多種類のポリペプチド、オリゴヌクレオチド等の物質である。

【0019】

【実施例】 以下、本発明を実施例によりさらに説明する。

（実施例） 1. プロープの合成を伴う反応性チップの製造

1cm×1cmの大きさのガラス製スライドガラス上に、10,000（100×100）個のスポットが形成されたものを基板として使用し、1000（100×25）個の吐出孔を有するノズルを4種類用意し、それぞれに保護基の付いたA、G、C、およびTを供給できるように供給路を介して試薬貯蔵槽が設けられて圧電／電歪素子を有する装置を用意し、図1に示したような順序で、A、G、C、およびTをスポッティングした。まず、A原料の入ったカートリッジを移動させ、所定のスポットにA原料を供給した。次に、A原料の入ったカートリッジが次の基板へ移って同じように所定のスポットに供給した。次に、G原料の入ったカートリッジが次の位置にG原料をスポットした。以降、T原料、C原料の入ったカートリッジが順番に動いてスポットした。第一塩基が合成された後、この一連の操作を18回繰り返し、合成された18量体のオリゴヌクレオチドが一定の規則性で登載された多数の反応性チップを得た。これにより、フォトリソグラフィーを用いる方法では、製造ロット数十枚であったのが、数100チップ以上の製造が迅速に行え、チップの量産化が可能となった。なお、保護基の着脱などを含め一般的な合成条件については、先に記載した文献に記載の条件に従った。

【0020】 2. 酵素を使用した反応性チップの製造例

上記1と同じ基板に、吐出用ノズル装置の試料貯蔵槽中に酵素を含む溶液を収納した。吐出ノズルを作動させ、酵素を含む溶液を、各溶液が他の溶液と接触しないように各スポットに担持させた。次いで、スポットに担持されている溶液から溶媒を蒸発させて、酵素のみがスポットに担持された本発明の反応性チップを得た。これにより約1cm×1cmの大きさの基板上に、10,000個の酵素のドットが独立して担持された反応性チップが得られた。吐出操作は、数分も掛からずに終了し、また、全体作業時間は、僅かに、1時間程度で極めて効率的であった。

【0021】

【発明の効果】 本発明によれば、フォトリソグラフィー設備等の特別な設備を要することなく、DNA断片等の反応性物質をその表面に集積した反応性チップを容易に提供することができる。また、スポッティング方法の様に製造技術上の物理的制約から最小化するとした場合がある為に、スポッティング部材の先端部分の直径

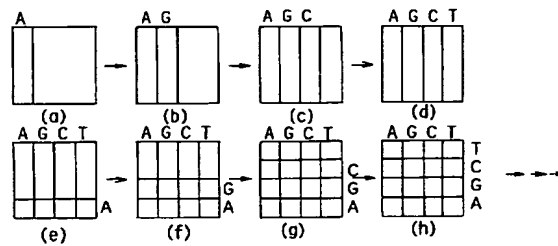
は、最小でも一回のスポットティング量が1 n lと大きく、必然的に高価な各種プローブを大量に使用しなければならなく、一回のスポットティング量は、同一数のスポットに対して200分の1から50分の1程度である5～20 p lと極めて少ない。この点でスポットティング方法と比較しても、遙かに経済的であることが明らかである。加えて、10,000スポットを有する

反応性チップを製造するに要する時間を、溶媒の乾燥時間を入れたとしても、僅かに、1時間程度であり、極めて効率的であることを明らかである。

【図面の簡単な説明】

【図1】 本発明に係るオリゴヌクレオチド製造方法の手順を模式的に示す。

【図1】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード (参考)
G 0 1 N 1/00	1 0 1	G 0 1 N 1/10	N 4 H 0 4 5
1/10		31/22	1 2 1 P
31/22	1 2 1	33/566	
33/566		35/02	F
35/02		C 1 2 M 1/34	E
35/10			F
// C 1 2 M 1/34		C 1 2 N 15/00	A
		G 0 1 N 35/06	A

F ターム (参考) 2G042 AA10 FA20 FB05 HA02
 2G058 AA09 CC02 CC11 EA11 EB00
 ED12 ED17 GA01
 4B024 AA11 AA20 BA07 BA31 BA41
 BA61 CA01 CA04 CA09 CA11
 HA14 HA19
 4B029 AA07 AA21 BB15 BB16 BB17
 CC03 CC08 FA01
 4B063 QA01 QA08 QA17 QA18 QA19
 QQ01 QQ12 QQ13 QQ21 QQ42
 QQ52 QQ58 QQ79 QQ96 QR32
 QR35 QR48 QR55 QR66 QR84
 QS33 QS34 QS36 QS39 QX02
 4H045 AA10 AA20 DA75 DA86 DA89
 EA50 FA80